

## KHẢ NĂNG PHÂN HỦY PHENOL CỦA MÀNG SINH HỌC TẠO RA BỞI CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ ĐẤT NHIỄM DẦU Ở VÙNG TÀU

Lê Thị Nhi Công<sup>1\*</sup>, Trịnh Thành Trung<sup>2</sup>, Cung Thị Ngọc Mai<sup>1</sup>, Đỗ Thị Tố Uyên<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, \*lenhicong@ibt.ac.vn

<sup>2</sup>Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

**TÓM TẮT:** Phenol và các hợp chất có chứa nhóm phenol là các chất gây ô nhiễm môi trường khá phổ biến trong nước thải nhiễm dầu của các khu khai thác dầu khí và các trạm xăng dầu. Để xử lý các hợp chất này, sử dụng vi sinh vật tạo màng sinh học đang là một trong những hướng đi mới hiện nay. Từ các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu diesel và một số hợp chất hydrocarbon có trong dầu mỏ, chúng tôi đã lựa chọn được chủng vi khuẩn VTPG5 vừa có khả năng tạo màng sinh học vừa có khả năng phân hủy phenol cao. Chủng này đã được phân loại bằng việc xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA và được đặt tên là *Rhodococcus* sp. VTPG5. Trình tự đoạn gen này đã được đăng ký trên ngân hàng NCBI với mã số là LC057207. Chủng VTPG5 được xác định là có khả năng tạo màng tốt nhất ở nhiệt độ 37°C, pH 7, nồng độ muối NaCl là 1,5% (w/v), nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sử dụng các điều kiện tối ưu này để tạo màng sinh học nhằm đánh giá khả năng phân hủy phenol của màng tạo thành, kết quả cho thấy hiệu suất phân hủy của màng sinh học chủng VTPG5 là 99,8% sau 7 ngày nuôi cấy với hàm lượng phenol ban đầu là 200 mg/l. Kết quả này mở ra hướng ứng dụng màng sinh học của chủng VTPG5 trong xử lý nước ô nhiễm phenol và các hợp chất có chứa nhóm phenol.

*Từ khóa:* *Rhodococcus*, màng sinh học, nước nhiễm dầu, phenol, phân hủy sinh học.

### MỞ ĐẦU

Hiện nay, do nhu cầu sử dụng dầu mỏ và các sản phẩm dầu mỏ trên thế giới ngày càng tăng nên không tránh khỏi các vấn đề ô nhiễm môi trường ở các mức độ khác nhau. Thành phần chủ yếu của dầu mỏ gây ô nhiễm môi trường là hydrocarbon no, hydrocarbon thơm đơn nhân và đa nhân [12]. Trong các hợp chất ô nhiễm đó, phenol là một hợp chất hữu cơ khó phân hủy và rất độc hại [4]. Vì vậy, việc xử lý phenol trong nước ô nhiễm dầu đặc biệt được chú trọng.

Trên thế giới, công nghệ màng sinh học đã được áp dụng trong nhiều lĩnh vực xử lý ô nhiễm môi trường [3]. Tuy nhiên, chưa có nhiều công bố về ứng dụng công nghệ màng sinh học để xử lý phenol. Công nghệ màng sinh học đã chứng minh có khá nhiều ưu điểm như: giá thành thấp, ít sử dụng hóa chất, thiết kế linh động, thích nghi với mọi loại hình công nghiệp và diện tích xử lý [3]. Đặc biệt màng sinh học từ vi sinh vật tạo thành cho thấy có khả năng xử lý các hợp chất hydrocarbon thơm trong đó có phenol rất tốt [4].

Với một nước có khí hậu nhiệt đới gió mùa, Việt Nam có khu hệ vi sinh vật tương đối đa dạng, đặc biệt là môi trường nước. Trong môi trường biển, vi khuẩn phân hủy hydrocarbon chiếm ưu thế, phân bố ngay cả ở trong vùng cực lạnh [10]. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành tuyển chọn chủng vi khuẩn vừa có khả năng tạo màng sinh học vừa có khả năng phân hủy phenol cao từ tập đoàn vi sinh vật đã được phân lập từ nước nhiễm dầu ở bờ biển Vũng Tàu. Từ đó, đánh giá khả năng phân hủy phenol của màng sinh học chủng vi khuẩn này.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chín chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu lấy ở bờ biển Vũng Tàu.

#### Tạo màng sinh học

Để đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn, phương pháp của Morikawa et al. (2006) [8] đã được sử dụng bằng cách đưa chủng nuôi cấy non vào môi trường đặc hiệu. Sau 2 ngày, màng sinh học tạo thành sẽ được rửa bằng nước cất và nhuộm với dung dịch tím. Màng hình thành này sẽ được rửa lại bằng

DMSO và đo ở bước sóng 570 nm. Các chủng có mật độ quang học cao sẽ được lựa chọn.

### **Đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn trên nguồn cơ chất phenol**

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường khoáng có bổ sung các nồng độ phenol khác nhau ở 30°C. Sau 1, 3, 5 và 7 ngày dịch nuôi cấy được lấy ra và đo ở bước sóng 600 nm.

### **Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét**

Hình thái tế bào của chủng vi khuẩn đã được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét S4800, Hitachi, Nhật Bản với độ phóng đại 15.000 lần. Quá trình này được thực hiện với sự phối hợp của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

### **Phân loại định tên vi khuẩn dựa trên so sánh trình tự 16S rRNA**

DNA tổng số của chủng vi khuẩn VTPG5 được tách chiết theo mô tả của Zhou et al. (1996) [13] và được dùng làm khuôn để khuếch đại gen 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu 9f (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') và 1525r (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'). Chu trình phản ứng: 94°C trong 5 phút; lặp lại 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây; 56°C trong 30 giây; 72°C trong 2 phút); 72°C trong 5 phút và 4°C để bảo quản. Tiếp đó sản phẩm PCR (kích thước khoảng 1500 bp) được tinh sạch và xác định trình tự trên máy xác định trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Gentic Analyzer, Hoa Kỳ. Việc so sánh trình tự nucleotide và xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn đại diện với các chủng vi khuẩn có trên ngân hàng Genbank (NCBI) sử dụng chương trình Blast, phần mềm Bioedit, Clustal X và Mega4.

### **Đánh giá ảnh hưởng của một số điều kiện sinh lý, sinh hóa lên khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn**

Đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện lên khả năng hình thành màng sinh học của các chủng vi khuẩn được tiến hành trong môi trường hiếu khí tổng số với các nhiệt độ thí nghiệm từ 25°C đến 50°C; pH từ 4 đến 9; nồng độ NaCl từ 0,5 đến 4% (w/v), các nguồn carbon được sử dụng bao gồm: glucose, lactose,

saccarose, mantose và các nguồn nitơ được sử dụng bao gồm: NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, pepton và cao nấm men.

### **Nghiên cứu khả năng phân hủy phenol của vi khuẩn**

Chủng vi khuẩn VTPG5 được nuôi cấy trên môi trường khoáng Gost dịch có bổ sung cơ chất phenol được nuôi cấy 200 vòng/phút ở 30°C. Khả năng phân hủy phenol của chủng vi khuẩn được xác bằng phương pháp đo quang theo Standard method SMEWW 5530 C (Choloroform Extraction Method). Tương đương với tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 6216:1996 (ISO 6439-1990), phương pháp trắc phổ dùng 4-aminoantipyrin. Quá trình phân tích phenol được thực hiện với sự phối hợp của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

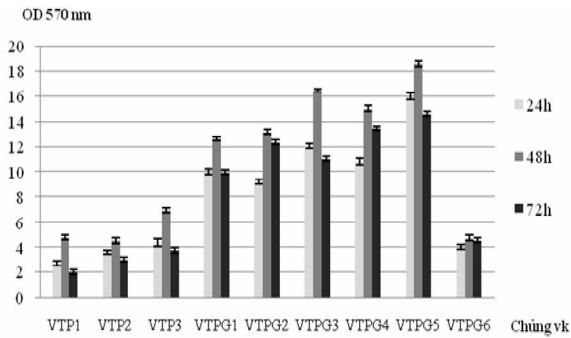
Tuyển chọn chủng vi khuẩn vừa có khả năng tạo màng sinh học vừa có khả năng phân hủy phenol cao

Từ 9 chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất nhiễm dầu ở bờ biển Vũng Tàu, chúng tôi đã tiến hành đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn. Trong 9 chủng vi khuẩn phân lập được có 5 chủng là VTPG1, VTPG2, VTPG3, VTPG4 và VTPG5 có khả năng tạo màng tốt nhất (độ hấp thụ tím tím thể tại bước sóng 570 nm là cao nhất). Tiếp tục khảo sát khả năng sinh trưởng và phát triển của 5 chủng vi khuẩn đó trên môi trường có bổ sung 50 ppm phenol, 0,1% glucose.

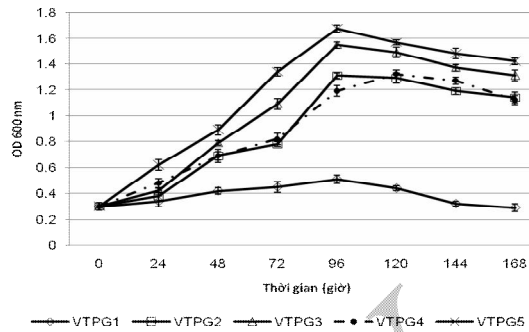
Hình 1 và hình 2 cho thấy, chủng vi khuẩn VTPG5 vừa có khả năng tạo màng vừa có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt trong môi trường có chứa 50 ppm phenol. Vì vậy, chúng tôi chọn chủng vi khuẩn VTPG5 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

### **Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn VTPG5**

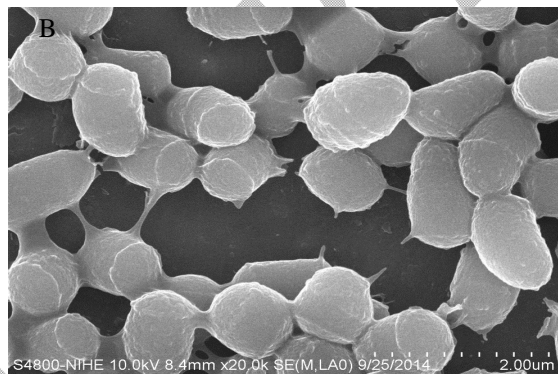
Khuẩn lạc chủng VTPG5 có màu cam, tròn, lồi, bóng ướt, có viền trắng trong xung quanh, D: 0,5-1 mm. Chủng VTPG5 là vi khuẩn Gram dương. Dưới độ phóng đại 20.000 lần, tế bào có hình que ngắn, kích thước (1,1-1,2) μm × (0,81-0,98) μm (hình 3).



Hình 1. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn



Hình 2. Khả năng sinh trưởng của các chủng VK trong môi trường có bổ sung phenol

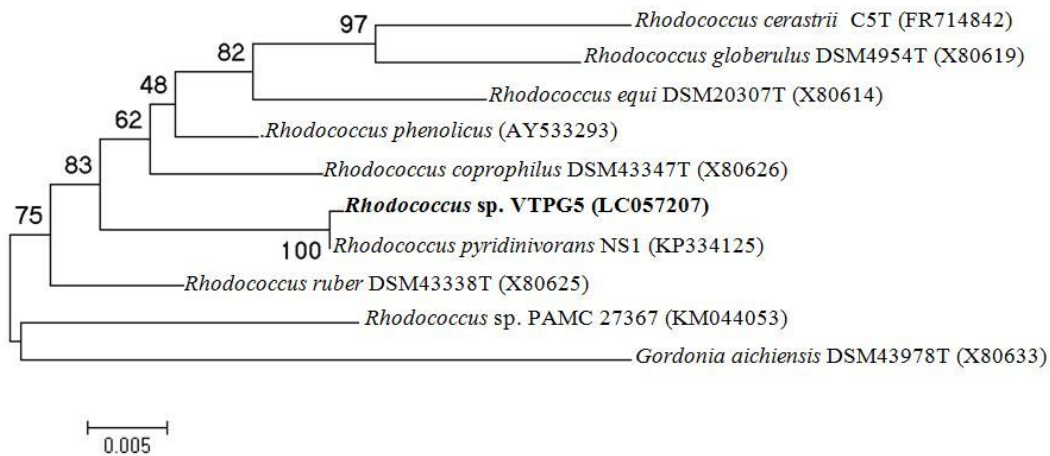


Hình 3. Hình thái khuẩn lạc (A) và hình thái tế bào (B) của chủng vi khuẩn VTPG5

**Phân loại chủng VTPG5 bằng việc xác định trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA**

Trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng vi khuẩn VTPG5 được xác định trực tiếp từ sản phẩm PCR khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu là 9f và 1525r tương đồng tới 99% với các

chủng thuộc chi *Rhodococcus*. Vì vậy, chủng VTPG5 được đặt tên là *Rhodococcus* sp.VTPG5. Trình tự đoạn gen này đã được đăng ký trên ngân hàng DDBJ với mã số là LC057207. Cây phát sinh chủng loại của chủng *Rhodococcus* sp. VTPG5 được chỉ ra ở hình 4.

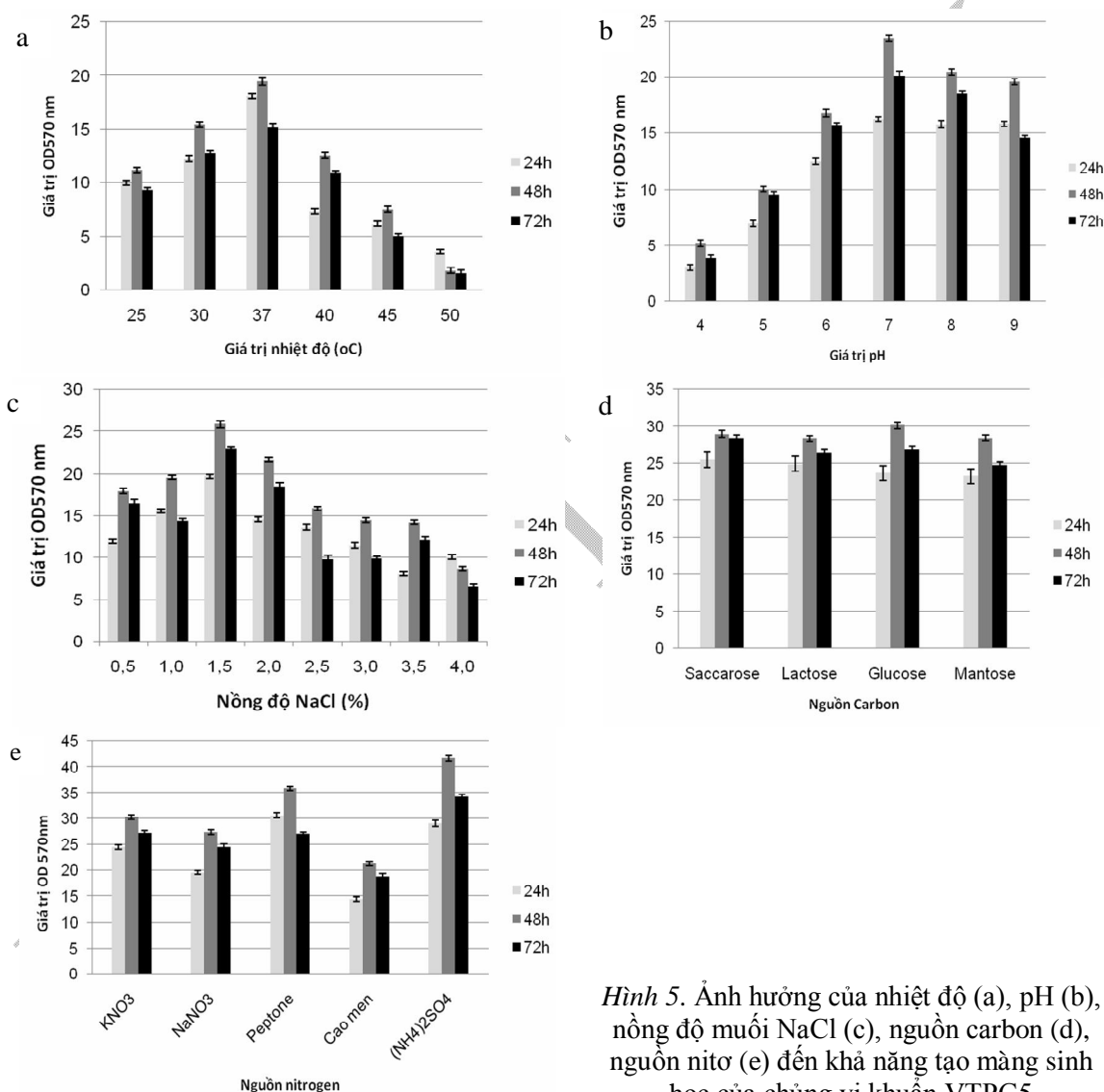


Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của chủng *Rhodococcus* sp.VTPG5

Hiện nay, đã có nhiều bài báo đề cập đến khả năng phân hủy phenol của các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học thuộc chi *Rhodococcus*, vì vậy, nghiên cứu này của chúng tôi bổ sung thêm vào bộ sưu tập các chủng vi khuẩn vừa có khả năng tạo màng, vừa có khả năng phân hủy phenol được phân lập tại nước ô nhiễm dầu bờ biển Việt Nam.

### Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sự hình thành biofilm của chủng VTPG5

Tại thời điểm 48 giờ, khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn VTPG5 đã được xác định là tốt nhất ở nhiệt độ 37°C, pH 7, nồng độ muối NaCl 1,5%, nguồn carbon là glucose, nguồn nitơ là (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (hình 5).



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ (a), pH (b), nồng độ muối NaCl (c), nguồn carbon (d), nguồn nitơ (e) đến khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn VTPG5

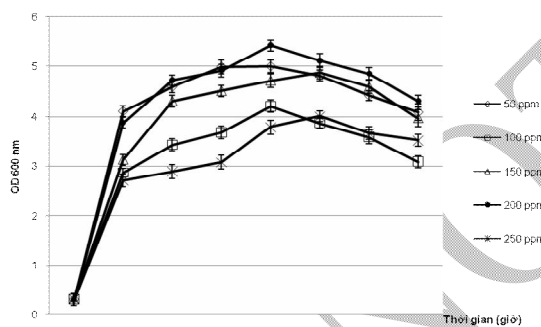
### Đánh giá khả năng phân hủy phenol của màng sinh học chủng vi khuẩn VTPG5

Màng sinh học của chủng VTPG5 tạo ra trong điều kiện tối ưu có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt nhất ở nồng độ 200 ppm phenol

(hình 6).

Tại nồng độ 200 ppm, chủng VTPG5 có khả năng phân hủy phenol với hiệu suất 99,8% sau 7 ngày nuôi cấy. Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về khả năng phân hủy phenol

của vi khuẩn thuộc các chi khác nhau. Nor Suhaila et al. (2010) [9] đã công bố chủng *Rhodococcus* UKM-P được phân lập từ nước ô nhiễm dầu có hiệu suất phân hủy phenol đạt 98,5% sau 7 ngày nuôi cấy với hàm lượng ban đầu là 0,4 ppm. Soudi & Kolahchi (2011) [11] đã công bố chủng *R. erythropolis* SKO-1 được phân lập từ đất nhiễm dầu ở Tehran, Iran có khả năng phân hủy phenol đạt 99,68% sau 3 ngày nuôi cấy. Liu et al. (2009) [5] đã công bố hai chủng *Acinebacter* sp.XA05 và *Sphingomonas* sp.FG03 được phân lập từ bùn hoạt tính và đất ô nhiễm phenol có hiệu suất phân hủy phenol lần lượt là 78% và 68% sau 60 giờ với hàm lượng ban đầu là 1 ppm. Nhóm tác giả Lin et al. (2008) [4] đã phân lập được chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* được phân lập từ nguồn nước thải công nghiệp có khả năng sử dụng 85,4% phenol với hàm lượng ban đầu là 3,2 ppm có bổ sung thêm 1% glucose sau 40 ngày nuôi cấy.



Hình 6. Khả năng sinh trưởng của chủng VTPG5 trong môi trường có bổ sung phenol ở các nồng độ khác nhau

Ở Việt Nam, có rất ít các nghiên cứu về phân hủy phenol của vi sinh vật. Tại Viện Công nghệ sinh học, nhóm tác giả Cung Thị Ngọc Mai (2010) [6, 7] đã phân lập được hai chủng vi khuẩn BTL6 và BTL11 từ nước thải khu công nghiệp Từ Liêm, Hà Nội có khả năng phân hủy phenol lần lượt là 86,86% và 99,34% sau 7 ngày nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 7 ppm và 100 ppm (có bổ sung thêm 0,5% glucose). Nhóm tác giả Le Thi Nhi Cong et al. (2012) [1] đã tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn tạo màng sinh học và có khả năng phân hủy tốt phenol từ các mẫu đất và nước nhiễm ở vùng biển Quảng

Ninh. Sau 9 ngày thử nghiệm, hỗn hợp các chủng vi khuẩn này đã phân hủy được trên 98% phenol với hàm lượng ban đầu là 150 ppm.

So sánh với các chủng vi khuẩn khác trên thế giới và ở Việt Nam, khả năng phân hủy phenol của chủng VTPG5 khá tốt. Các chủng khác có thời gian nuôi cấy khá lâu (40 ngày), trong khi chủng VTPG5 chúng tôi nuôi thử nghiệm sau 7 ngày trên lượng phenol ban đầu là 200 mg/l. Những kết quả này đã phần nào cho thấy vai trò của từng chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng tốt và khả năng phân hủy nước ô nhiễm phenol. Chủng vi khuẩn này sẽ được chúng tôi bổ sung tạo màng sinh học đa chủng để xử lý nước thải ô nhiễm phenol tại khu vực này hay các loại nước ô nhiễm có tính chất tương tự.

## KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp.VTPG5 (LC057207) có khả năng tạo màng tốt nhất đã được tối ưu ở 37°C, pH 7, nồng độ muối NaCl là 1,5%, nguồn carbon là glucose, nguồn nitrogen là  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sau 4h giờ nuôi tĩnh. Tại điều kiện tối ưu, màng sinh học do chủng vi khuẩn này tạo thành có khả năng phân hủy 99,8% phenol với hàm lượng ban đầu là 200 ppm.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài do Bộ Khoa học và Công nghệ cấp, mã số KC.04.21/11-15 và sử dụng trang thiết bị Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Le Thi Nhi Cong, Ho Thanh Huyen, Nghiem Ngoc Minh 2012. Phenol degradation of a biofilm formed by a mixture of marine bacteria. VNU J. Sci., Natur. Sci. Technol., 28(2S): 75-81.
2. Goto M., Kato M., Asaumi M., Shirai K., Venkateswaran K., 1994. TLC/FID method for evaluation of the crude-oil-degrading capability of marine microorganisms. J. Mar. Sci. Biotechnol., 2: 45-50.
3. Lazarova V., Manem J., 2000. Innovative biofilm treatment technologies for waste

- and wastewater treatment. In: Bryers JD (ed) *Biofilm II: process analysis and application*. Wiley-Liss, Inc: 159-206.
4. Lin J., Reddy M., Moorthu V., Qoma B.E., 2008. Bacterial removal of toxic phenol from an industrial effluent. *Afr. J. Biotechnol.*, 7(13): 2232-2238.
  5. Liu Y. J., Kuschik P., Zhang A., Wang X. C., 2009. Characterization of phenol degradation by *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Chem. Ecol.*, 25(2): 107-117.
  6. Cung Thị Ngọc Mai, Trần Hải Đăng, Nguyễn Văn Bắc, Nghiêm Ngọc Minh, 2010. Nghiên cứu khả năng phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân và phenol của chủng vi khuẩn BTL11 phân lập từ nước thải khu công nghiệp. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(3B): 1739-1744.
  7. Cung Thị Ngọc Mai, Trần Thị Khánh Vân, Nghiêm Ngọc Minh, 2010. Hình thái tế bào và khả năng phân hủy PAH và phenol của chủng vi khuẩn phân lập từ nước thải khu công nghiệp. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 68(6): 101-106.
  8. Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R., Kanaya S. 2006. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma polyglutamate. *Microbiology*, 152: 2801-2807.
  9. Nor Suhaila, Y., Ariff, A., Rosfarizan M., Abdul Latif I., Ahmad S.A., Norazah M. N., Shukor M. Y. A., 2010. Optimization of parameters for phenol degradation by *Rhodococcus* UKM-P in Shake. *Proceedings of the World Congress on Engineering*, 1: 601-604.
  10. Perron N., Welander U., 2004. Degradation of phenol and cresols at low temperatures using a suspended-carrier biofilm process. *Chemosphere*, 55(1): 45-50.
  11. Soudi M.R., Kolahchi N., 2011. Bioremediation potential of a phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1. *Progress in Biological Sciences*, 1(1): 31-40. Winter/Spring.
  12. Swoboda-Collberg N. G., 1995. Chemical contamination of the environment: sources, types and fate of synthetic organic chemicals. In: Young, L.Y., Cerniglia, C.E. (Eds.), *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Wiley, New York, USA: 27-74.
  13. Zhou J., Bruns M. A., Tiedje J. M., 1996. DNA Recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(2): 316-322.

## PHENOL DEGRADATION OF BIOFILM FORMED BY BACTERIAL STRAIN ISOLATED FROM OIL POLLUTED WATER SAMPLES COLLECTED IN VUNG TAU

Le Thi Nhi Cong<sup>1</sup>, Trinh Thanh Trung<sup>2</sup>, Cung Thi Ngoc Mai<sup>1</sup>, Do Thi To Uyen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, VAST

<sup>2</sup>Institute of Microorganism and Biotechnology, Vietnam National University - Hanoi

### SUMMARY

Phenol and phenolic compounds are found as major pollutants in various types of environmental sites. They exist in industrial wastewater of oil refineries, and petrochemical and phenol resin industry plants. To remove these components, using biofilm-forming microorganisms is new approach currently. From isolated bacteria which could degrade diesel oil and several hydrocarbon components containing in crude oil, we selected the strain VTPG5 having capacity of biofilm formation and phenol utilization. Comparing of the part of 16S rRNA of the strain with bacterial strains in NCBI and LNSP by using specific primer pair 9f and 1525r, this strain belonged to the genus *Rhodococcus* then was named *Rhodococcus* sp.VTPG5. The gene was

registered in Genbank NCBI with accession number LC057207. The optimal conditions to form biofilm of the strain after 48 hours were elucidated at 37°C, pH 7, 1.5% of NaCl with glucose and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as carbon and nitrogen sources, respectively. These optimal biofilm-forming conditions were conducted to investigate phenol degradation capacity. As the result, the phenol degradation productivity of the biofilm formed by VTPG5 was 99.8% after 7 day-incubation with the initial concentration of 200 mg/l. The result gave a hint to apply the biofilm formed by VTPG5 to remove phenol and phenolic compounds from waste-water.

*Keywords:* *Rhodococcus*, biofilm, biodegradation, oil polluted wastewater, phenol.

*Ngày nhận bài:* 21-9-2015